



TITLE:

Synergistic gene editing in human iPS cells via cell cycle and DNA repair modulation(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Maurissen, Thomas Luc

CITATION:

Maurissen, Thomas Luc. Synergistic gene editing in human iPS cells via cell cycle and DNA repair modulation. 京都大学, 2020, 博士(医科学)

ISSUE DATE:

2020-07-27

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22700>

RIGHT:

NATURE COMMUNICATIONS

京都大学	博士（医科学）	氏 名	Thomas Luc Maurissen
論文題目	Synergistic gene editing in human iPS cells via cell cycle and DNA repair modulation (細胞周期およびDNA修復調節を介したヒトiPS細胞における相乗的遺伝子編集)		
(論文内容の要旨)			
<p>Precise gene editing aims to generate targeted genetic modifications at single-nucleotide resolution in order to correct or recreate human pathogenetic variants associated with disease. However, precision editing with nucleases such as CRISPR-Cas9 has seen limited success due to poor efficiency and limited practicality. The main reasons include low frequency of homology-directed repair (HDR) and predominant on-target mutagenesis by mutagenic end joining (MutEJ), leading to unreliable editing.</p> <p>Here, a fluorescent DNA repair assay was established in human induced pluripotent stem (iPS) cells to visualize and quantify the frequency of DNA repair outcomes during monoallelic and biallelic targeting. Modulating both DNA repair and cell cycle phase via defined culture conditions and small molecules was found to synergistically enhance the frequency of homology-directed repair (HDR). Targeting in homozygous reporter cells resulted in high levels of editing with a vast majority of biallelic HDR outcomes. However, nearly no heterozygous outcomes were obtained because both alleles were systematically targeted and edited. Therefore, high HDR efficiency was leveraged with mixed ssODN repair templates to generate compound heterozygous mutants containing a mutant and a protected allele.</p> <p>Finally, synergistic gene editing was shown to increase HDR frequency at endogenous loci, confirming the broad applicability of this strategy to generating precise genetic modifications in the human genome.</p>			

<p>(論文審査の結果の要旨)</p> <p>遺伝子編集技術をヒト疾患関連病原性変異の修復や再現に活用するためには、対象となる遺伝子改変を一塩基のレベルで正確に行う必要がある。しかしながら、CRISPR-Cas9などのヌクレアーゼを使用したゲノム編集技術は、相同組換え修復（HDR）の頻度が低いこと、変異誘発末端結合（MutEJ）によるオンターゲット変異が優位であることから、ゲノム編集の正確性が低く、現時点では実用性が限られている。</p> <p>本研究ではこの点の克服に向け、蛍光によるDNA修復評価法をヒト人工多能性幹（iPS）細胞で確立し、DNA修復頻度の視覚化と定量化を行うことでHDRが上昇する条件を検討した。その結果、培養中に低温ショックを与え、低分子化合物を用いて細胞周期の同期とDNA修復の調節を行うことにより、相同組換え修復（HDR）の頻度が相乗的に増加することが明らかになった。しかしながら、HDRが高頻度で起こるため両アレルがゲノム編集されてしまい、ヘテロ接合型変異体を得るゲノム編集を行うことは困難であった。そこで、変異を生成するssODNとサイレント変異を起こすssODNの混合ssODN修復テンプレートを用いたところ、最終的に高いヘテロ接合型変異効率を得ることに成功した。</p> <p>以上の研究は、細胞周期とDNA修復調節を行うことで、内在性遺伝子座でのHDR頻度が増加することを明らかにし、正確に遺伝子編集を行うための技術開発に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医科学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、令和 02 年 06 月 29 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日 以降